

Crecimiento de *Chaetoceros sp.* y *Nitzschia sp.* en cultivo uni y bialgal a diferentes concentraciones de cobre

Soraya Silva* y Joseph Jay Ewald

Laboratorio de Microalgas, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias
La Universidad del Zulia, Maracaibo 4011, Venezuela

Recibido: 20-07-95 Aceptado: 31-07-96

Resumen

Se determinó el crecimiento de *Chaetoceros sp.* (diatomea céntrica) y *Nitzschia sp.* (diatomea pennada) bajo diferentes concentraciones de cobre, tanto en cultivo unialgal como bialgal. Ambos clones fueron aislados del Lago de Maracaibo. Se utilizó el sistema de cultivo "batch" continuo y dos salinidades, 20 y 35‰. La actividad iónica cúprica se controló a diferentes niveles al usar un sistema buffer NTA-Cu. Para evaluar los resultados los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza para determinar la existencia de efectos significativos de los factores de estudio. De acuerdo a los resultados obtenidos, la diatomea pennada *Nitzschia sp.* parece ser más resistente a altas concentraciones del cobre (10 y 20 μM) que *Chaetoceros sp.*, siendo ambas tolerantes a las bajas concentraciones del mismo (0,001; 0,1; 1 y 2 μM), debido quizás a procesos de desintoxicación interna. El principal efecto del cobre fue la reducción de la tasa de crecimiento y la formación de células deformes. El efecto inhibitorio fue más marcado cuando ambas algas crecieron en cultivo bialgal, donde se evidenció, además, que la presencia de una microalga afecta la respuesta de la otra.

Palabras claves: *Chaetoceros*; cobre; cultivos bialgales; cultivos unialgales; diatomeas; *Nitzschia*.

Growth of *Chaetoceros sp.* and *Nitzschia sp.* in uni and bialgal cultures under different copper concentrations

Abstract

Growth rates of local clones of *Chaetoceros sp.* (a centric diatom) and *Nitzschia sp.* (a pennate diatom) subjected to different concentrations of copper were determined for unialgal and bialgal cultures using continuous "batch" techniques and two salinities (20 and 35‰). Both clones were isolated from Maracaibo Lake. Ionic copper activity was controlled at all levels using a NTA-Cu buffer system. Results obtained were subjected to analysis of variance to determine possible significance effects. The results obtained showed the pennate diatom *Nitzschia sp.* to be more resistant to high concentrations of copper (10 and 20 μM) than *Chaetoceros sp.*, both being tolerant to the lower concentrations of copper (0.001; 0.1; 1 and 2 μM). This may be due to internal detoxification processes. The principal effect observed was

* Autor para la correspondencia. e-mail: asaied@rsmas.miami.edu.

the reduction in growth rates and the presence of deformed cells. When bialgal cultures are considered, there seems to be evidences that one alga affects the response of the other.

Key words: Bialgal cultures; *Chaetoceros*; copper; diatoms; *Nitzschia*; unialgal cultures.

Introducción

El interés en los problemas de la contaminación de los ecosistemas acuáticos ha llevado al establecimiento de métodos para determinar el efecto que pueden tener diferentes sustancias tóxicas. Estos métodos incluyen el uso de algas microscópicas, las cuales, en general, son consideradas como buenos bioindicadores para emplearse en pruebas de toxicidad. La conveniencia de utilizar microalgas en bioensayos de toxicidad se basa en el hecho de que las algas constituyen el primer eslabón de la cadena trófica y por lo tanto, cualquier daño que sufran puede repercutir sobre todo el equilibrio acuático (1). Además, se puede manejar un gran número de organismos (células), las cuales son relativamente fáciles de mantener en el laboratorio.

Los bioensayos con algas se han usado exitosamente para establecer criterios sobre la calidad del agua en relación a sustancias tóxicas, tales como metales, tanto en agua dulce como marina (2-5). Uno de los metales que ha sido objeto de numerosos estudios es el cobre, el cual presenta la particularidad de que es un micronutriente esencial para las microalgas, pero al mismo tiempo puede llegar a ser tóxico (6-9).

La importancia del cobre como un nutriente traza en el metabolismo algal ha sido demostrado ampliamente. El cobre es un componente esencial del sistema de transporte electrónico y un componente del cofactor de muchas enzimas (10).

Los efectos biológicos del cobre en los ambientes dulceacuícolas y marinos han sido estudiado extensamente. Estos estudios implican tanto respuestas fisiológicas de las microalgas a concentraciones elevadas (o reducidas) del metal, como la impor-

tancia de la forma química del cobre en relación a su toxicidad (11).

Las diatomeas, tanto céntricas como pennadas constituyen un grupo de microalgas que se han usado frecuentemente como organismos de prueba en bioensayos de toxicidad. En este sentido, varios investigadores han evaluado el efecto del cobre sobre diferentes diatomeas. Mandelli (12) demostró la inhibición del crecimiento de la diatomea pennada *Nitzschia closterium* similar a la observada para *Skeletonema costatum*. Steemann y Nielsen (13) observaron inhibición del crecimiento de *Nitzschia palea*. Fisher y Froud (14) examinaron el efecto del cobre sobre el crecimiento de *Nitzschia closterium* y *Asterionella japonica*. Lumsden y Florence (15) demostraron un desacoplamiento entre la fotosíntesis y la división celular en *Nitzschia closterium* bajo concentraciones altas de cobre.

Los estudios sobre los efectos tóxicos del cobre tienden a ser pruebas de laboratorio con una sola especie (16). Las pruebas de toxicidad con una especie indican la sensibilidad relativa de varios organismos individuales, pero no indican las posibles interacciones entre los organismos o entre los organismos y el tóxico.

Estudios recientes, a nivel de laboratorio, han demostrado que la respuesta algal a diferentes tóxicos puede ser modificada por la presencia de otra alga (17-19). Por ejemplo, se ha demostrado que la competencia dentro de comunidades planctónicas es un factor biótico importante en un estudio sobre el efecto de un herbicida, atrazina, en ecosistemas dulceacuícolas (20).

El propósito de este estudio fue el de determinar las respuestas de crecimiento de dos microalgas autóctonas, aisladas del Lago de Maracaibo, *Chaetoceros* sp. (diato-

mea céntrica) y *Nitzschia* sp. (diatomea penada), ante diferentes concentraciones de cobre y dos salinidades, 20 y 35‰ en cultivo unialgal y cultivo mixto.

Materiales y Métodos

Microalgas utilizadas

Dos cultivos clonales de *Chaetoceros* sp. (CHT-M) y *Nitzschia* sp. (NT-M) fueron obtenidos de la Colección Permanente de Cepas de Microalgas del Laboratorio de Microalgas del Departamento de Biología de la Facultad Experimental de Ciencias de LUZ. Ambos clones fueron aislados de muestras de agua del Estrecho del Lago de Maracaibo en 1986.

Medio de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo BWM (21) a 35‰ y 20‰ de salinidad. El agua de mar utilizada para preparar este medio fue colectada en el Golfo de Venezuela. Esta se filtró con filtro Millipore 0,45 µm y posteriormente fue esterilizada en autoclave durante 15 minutos. Las soluciones madre de los nutrientes se esterilizaron por separado en autoclave.

El agua de mar se enriqueció con 1 ml de cada solución madre por litro de agua, a excepción del silicato (0,5 ml): 10^{-4} M NaNO_3 , 10^{-5} M NaH_2PO_4 , 4×10^{-5} M Na_2SiO_3 , 10^{-4} M NTA (ácido nitriloacético), 10^{-7} M FeEDTA, 10^{-8} M ZnSO_4 , 10^{-8} M MnSO_4 , 10^{-8} M Ma_2MoO_4 , 10^{-8} M CoSO_4 , 3×10^{-8} M Tiamina, 2×10^{-10} M Biotina, $3,7 \times 10^{-11}$ M Vitamina B_{12} . Las concentraciones de CuSO_4 fueron 0,001 (Control), 0, 1, 1, 2, 4, 10 y 20 µM.

Se utilizó como envase de cultivo fiolas Erlenmeyer de 250 ml, con 150 ml de medio de cultivo.

Sistema de cultivo "batch" continuo

El estudio se efectuó a una temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y a una intensidad luminica de aproximadamente 3.000 lux. Los cultivos

se desarrollaron en cultivos "batch" continuos (21) con un ciclo de luz-oscuridad de 14h:10h, durante 5 semanas. El método de cultivo consiste en el establecimiento secuencial de nuevos cultivos "batch" al transferir un inóculo de cada cultivo "batch" en fase exponencial, cuando el cultivo alcanza aproximadamente 1/10 de la densidad, a la cual comienza la limitación de nutrientes (22). La transferencia continua, cada 5 días, da como resultado una línea de cultivo que nunca experimenta una reducción significativa en los niveles de nutrientes en el medio. El mantenimiento de este cultivo en un ambiente constante permite la determinación de tasas de reproducción aclimataadas de numerosas réplicas secuenciales. En este caso se utilizaron 5 réplicas secuenciales.

Se utilizaron 2 ml de inóculo con una densidad de $1,5 \times 10^6$ células/ml para iniciar cada cultivo, tanto para el unialgal como el mixto.

Determinación del crecimiento

La densidad celular se determinó por contajes diarios empleando el hematocitómetro (0,1 mm profundidad) con rayado Neubauer. La determinación de la tasa de crecimiento (duplicaciones/día) está basada en contajes durante un mínimo de tres períodos de muestreos consecutivos de la porción exponencial de las curvas de crecimiento. La tasa de crecimiento se calculó por la siguiente ecuación (23):

$$\mu = \frac{\text{Ln}X_1 - \text{Ln}X_0}{t_1 - t_0} \quad [1]$$

donde: t_1 , t_0 corresponden al tiempo final e inicial de la fase logarítmica. X_1 , X_0 corresponden a la densidad celular final e inicial de la fase logarítmica.

Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados se utilizó el Sistema de Análisis Estadístico (SAS) (24). Se realizó un análisis de varianza

para determinar la existencia de efectos significativos de los factores de estudio, realizando previamente la transformación de los datos a raíz cuadrada (25).

Para este análisis se utilizó el siguiente modelo aditivo lineal:

$$Y_{ijk} = \mu + S_{i+Tj} + C_k + (ST)_{ij} + (SC)_{ik} + (TC)_{jk} + (STC)_{ijk} + E_{ijkl}$$

donde:

Y_{ijk} = observación de la variable respuesta correspondiente al k-ésimo tratamiento de cobre de la j-ésima alga de la i-ésima salinidad,

$i = 1, \dots, S = 2$ (Salinidad)

$j = 1, \dots, T = 2$ (Tipo de cultivo: unialgal-bialgal)

$k = 1, \dots, C = 7$ (Concentraciones de cobre)

$l = 1, \dots, r = 5$ (Réplicas)

E_{ijkl} = Error Experimental

Resultados

De acuerdo al análisis de varianza (Tabla 1) efectuado para *Chaetoceros*, hubo diferencia significativa ($P < 0,05$) de la tasa de crecimiento de esta microalga a las dos salinidades. Hubo efecto altamente significativo ($P < 0,01$) del resto de los tratamientos individuales (Tipo de Cultivo y Cobre). Además, la respuesta observada fue el producto de interacciones significativas (Sal-Tipo de Cultivo, Sal-Cu y Tipo de Cultivo-Cu). En la Figura 1a evidenciamos el efecto de diferentes concentraciones de cobre sobre la tasa de crecimiento de *Chaetoceros* en cultivo unialgal a 20‰. Se observó una ligera tendencia al aumento de la tasa de crecimiento a partir de 1 μM . A partir de la concentración 4 μM disminuyeron estos valores. De esta manera, las concentraciones altas del metal inhibieron significativamente el crecimiento de *Chaetoceros*. Por otro lado, cuando esta microalga se desarrolla en cultivo bialgal con *Nitzschia* la tasa de crecimiento aumentó en las concentraciones más altas del metal.

Tabla 1
Análisis de varianza de la tasa de crecimiento de *Chaetoceros sp.* Cultivo unialgal y bialgal

Fuente de Variación	GL	F
Total	139	
Sal	1	5,42*
Tipo de Cultivo	1	417,11**
Cobre	6	6,69**
Sal-Tipo de Cultivo	1	30,34**
Sal-Cobre	6	9,80**
Tipo de Cultivo-Cu	6	30,88**
Error Experimental	122	
CV = 19,60 %		$R^2 = 0,89\%$

* = P 0,05. ** = P 0,01

Tabla 2
Análisis de varianza de la tasa de crecimiento de *Nitzschia sp.* Cultivo unialgal y bialgal

Fuente de Variación	GL	F
Total	139	
Sal	1	2,50 NS
Tipo de Cultivo	1	635,32 **
Cobre	6	2,02 NS
Sal-Tipo de Cultivo	1	33,98 **
Sal-Cu	6	2,50 *
Tipo de Cultivo-Cu	6	1,66 NS
Error Experimental	112	
CV = 22,70 %		$R^2 = 0,86\%$

* = P 0,05; ** = P 0,01; NS = No Significativo.

Cuando *Chaetoceros* se desarrolló a 35‰ (Figura 1b), hubo efecto inhibitorio del metal ($P < 0,01$) a las concentraciones más altas, en el cultivo unialgal, mientras que en el bialgal no se observó dicho efecto.

Para el caso de *Nitzschia*, el análisis de varianza demuestra que no hay diferencia significativa en su crecimiento a 20 y 35‰, tampoco hubo efecto significativo del cobre, ni de la interacción Tipo de Cultivo-Cu (Tabla 2). Al parecer, para el caso de *Nitzschia*,

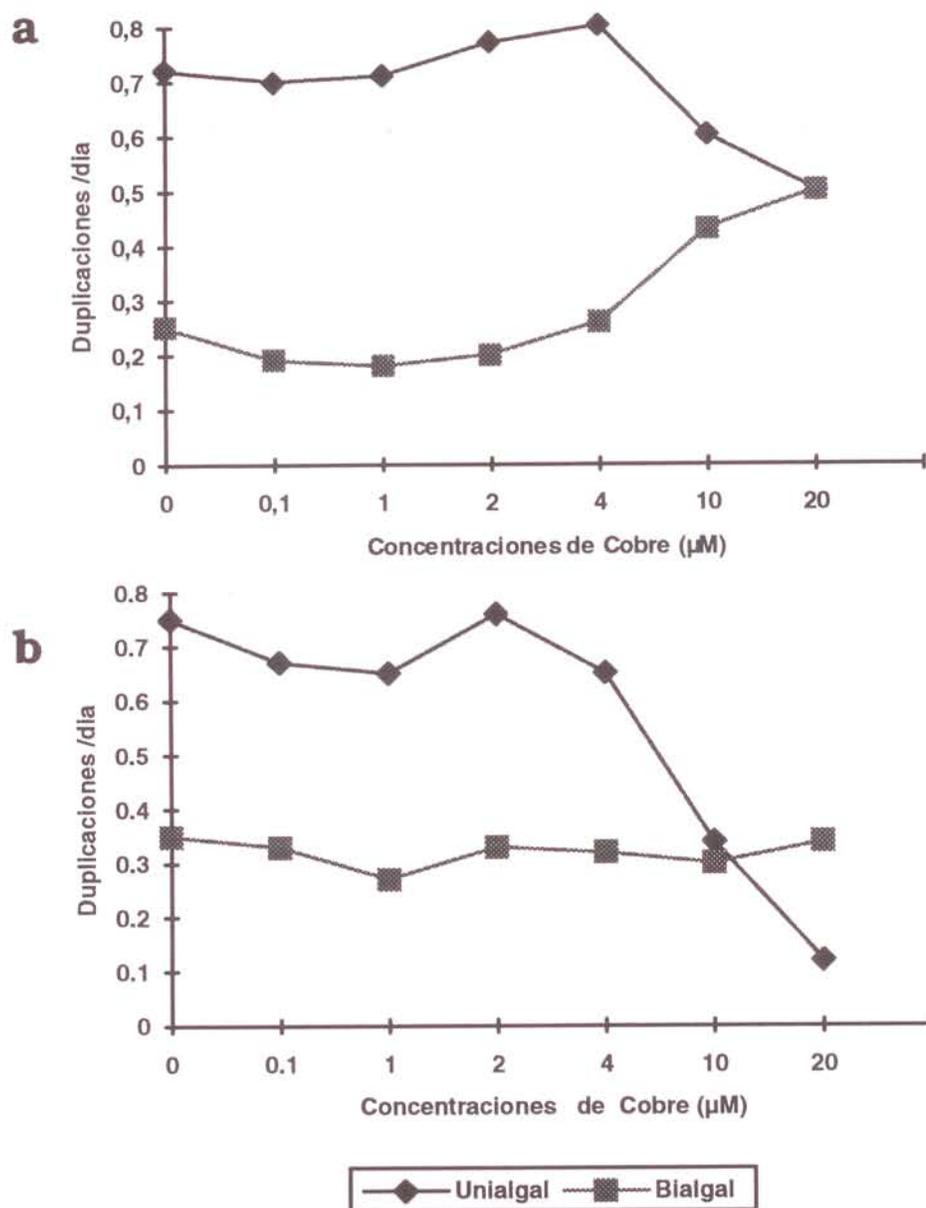


Figura 1. Tasas de crecimiento de *Chaetoceros sp.* bajo diferentes concentraciones de cobre en cultivo unialgal y bialgal, (a) 20‰ y (b) 35‰.

el efecto del metal no depende del tipo de cultivo, es decir, si es unialgal o bialgal. Hubo diferencia altamente significativa ($P < 0,01$) en el crecimiento de *Nitzschia* en el cultivo unialgal y bialgal. Igualmente hubo efecto significativo de la interacción Sal-Tipo de Cultivo y Sal-Cu.

Nitzschia mostró resistencia a las diferentes concentraciones de cobre en cultivo unialgal a 20‰ (Figura 2a). En cultivo bialgal a esa misma salinidad los valores de la tasa de crecimiento son más bajos, pero se mantienen estables en todas las concentraciones. A 35‰ en cultivo unialgal (Figu-

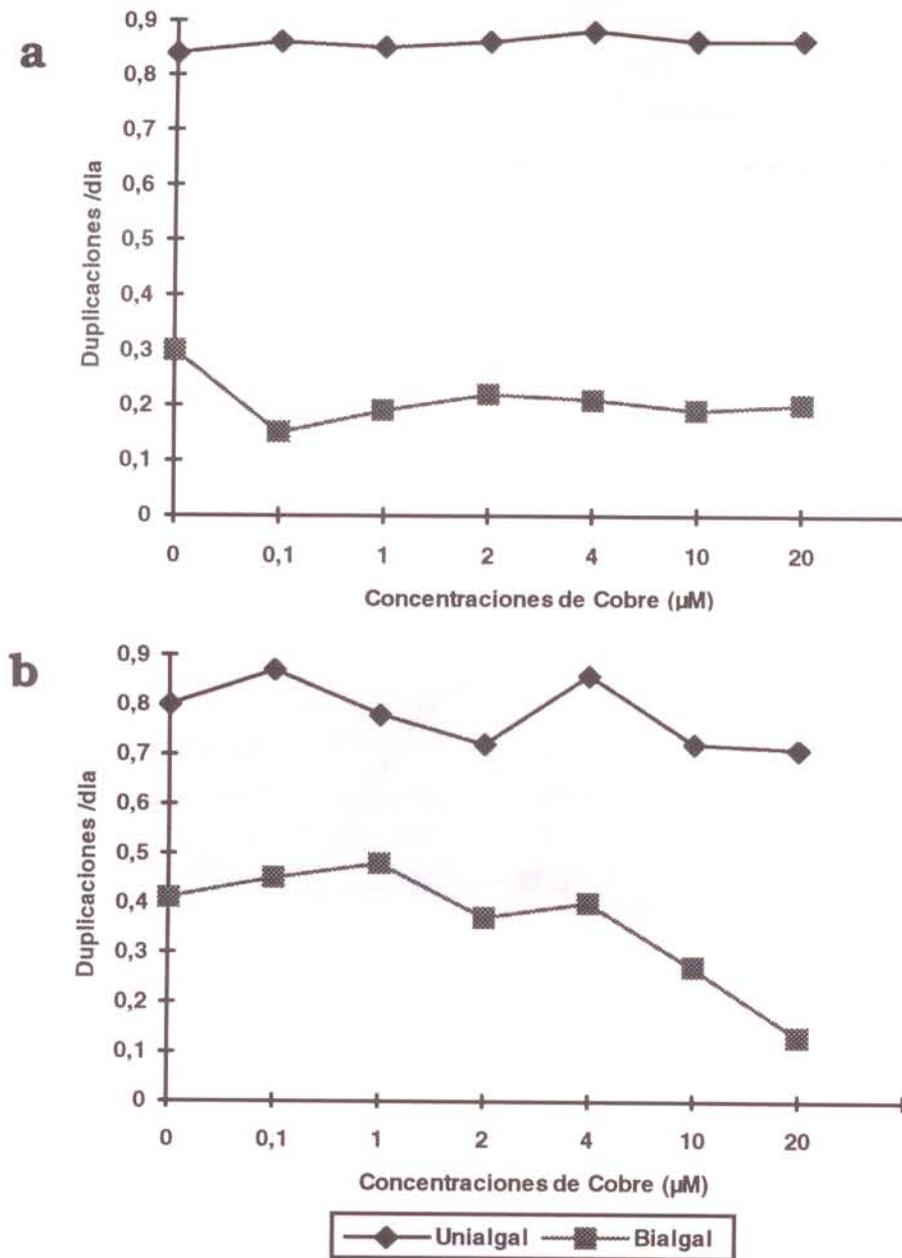


Figura 2. Tasas de crecimiento de *Nitzschia sp.* bajo diferentes concentraciones de cobre en cultivo uni y bialgal, (a) 20‰ y (b) 35‰.

ra 2b), el crecimiento de *Nitzschia* no fue afectado significativamente por el cobre. Por otro lado, en el cultivo bialgal hubo una ligera disminución de la tasa de crecimiento en las concentraciones altas del metal.

Discusión

La disminución de las tasas de crecimiento a concentraciones altas de cobre se ha atribuido principalmente a la unión del metal a grupos sulfhidrilos, los cuales son

importantes en la regulación de la división celular vegetal (26). Es por esta razón que también se dieron efectos a nivel de la morfología de las algas, debido a un desacoplamiento entre división celular y crecimiento, lo cual ha sido reportado previamente (27-30). Este efecto se manifestó a través de la producción de células deformes para el caso de *Chaetoceros sp.* y la formación de filamentos de varias células para el caso de *Nitzschia sp.*

Es importante señalar que la disponibilidad biológica de los metales traza, en términos de la limitación de nutrientes y la toxicidad, está relacionada con las concentraciones iónicas libres acuosas y no con la concentración total de los metales o con los complejos con el metal (31-33).

Existe una amplia variabilidad en la respuesta del fitoplancton al cobre, tanto entre diferentes especies como entre clones de la misma especie (34). El efecto de las condiciones de cultivo sobre la respuesta del fitoplancton al cobre puede ser muy complejo. La salinidad, al igual que la luz y la temperatura pueden interactuar con las respuestas del cobre. En el caso de la salinidad parte del efecto puede deberse al cambio del equilibrio químico (35), pero la respuesta al metal varía de acuerdo al organismo implicado. En este estudio hubo diferencia significativa en el crecimiento a las dos salinidades probadas sólo para el caso de *Chaetoceros*.

Se ha reportado que la salinidad por sí sola no modifica grandemente la toxicidad de contaminantes (36). El aspecto importante es la naturaleza genética del organismo sujeto al contaminante. Esto determina si puede adaptarse a una salinidad dada y de esta manera afectar la tolerancia a los contaminantes. En este sentido es determinante si el organismo ha sido aclimatado o no a la salinidad a la cual se va a efectuar el ensayo. Las algas utilizadas en este estudio fueron aclimatadas al medio y a la salinidad del ensayo, es por esta razón que las

diferencias obtenidas en los resultados en 20 y 35‰ podrían atribuirse a la naturaleza genética de cada una de las microalgas.

La mayoría de los estudios que emplean diatomeas han reportado reducción en el crecimiento dentro de un rango de 0,1 a 1 μM de cobre (11). En nuestro estudio la reducción significativa del crecimiento se observó a 10 y 20 μM , lo que evidencia la mayor resistencia de estos clones algales que los reportados por Metaxas (11).

En relación a la resistencia observada en ambas microalgas a las concentraciones bajas, hay que considerar que ambos clones utilizados provienen del Lago de Maracaibo, el cual es un cuerpo de agua contaminado y en este sentido se ha demostrado que algas aisladas de cuerpos de agua contaminados muestran mayor tolerancia al stress tóxico que las algas provenientes de cuerpos de agua no contaminados (29,37,38). Esta tolerancia puede deberse a mecanismos de exclusión o procesos internos de desintoxicación. Los primeros incluyen producción y liberación de material orgánico, que forma complejos con el metal haciéndolo no tóxico (7,39), la secuestación del metal en la pared celular (40) o cubierta mucilaginosa (41) y cambios en la permeabilidad de la membrana, que altera la absorción y excreción del metal (29). Se ha demostrado que las microalgas son capaces de efectuar desintoxicación interna empleando agentes que quelan a los metales con ligandos orgánicos y/o secuestrándolos en complejos intranucleares (42) y posiblemente en cuerpos de polifosfato citoplasmático (43). Las diatomeas son capaces de quelar y por lo tanto, posiblemente desechar metales pesados por medio de la excreción de compuestos orgánicos (13,44).

Debido a que las algas forman la base de la cadena alimenticia acuática, los mecanismos de tolerancia que implican la exclusión del metal pueden ser importantes para la ecología de ambientes contaminados.

Algunas especies de fitoplancton pueden vivir en una amplia gama de concentraciones de metales. Esto hace suponer que algunas especies han desarrollado mecanismos de adaptación del crecimiento bajo condiciones de disponibilidad del metal, tanto altas como bajas. Varios investigadores (45) han demostrado que las diatomeas bajo stress secretan mucilagos que posiblemente podrían absorber el cobre y desintoxicarlas. Este mecanismo podría ser un factor influyente en la mayor resistencia de *Nitzschia* que de *Chaetoceros*.

Uno de los resultados más interesantes de este estudio fue la tendencia al aumento de la tasa de crecimiento de *Chaetoceros* y *Nitzschia* en algunas concentraciones del metal. Estos incrementos pueden ser casos de "hormesis", un fenómeno bien documentado que resulta de una sobrecompensación de los procesos regulados homeostáticamente, como el crecimiento, en respuesta al stress tóxico (21). Es posible además, que cuando se alcanza el nivel inhibitorio del cobre se remueve una porción mayor de la población. Si este es el caso, la población que permanece va a ser más pequeña, pero capaz de resistir concentraciones más altas de cobre.

La densidad algal de ambas microalgas fue menor en los cultivos bialgales. En este sentido, los estudios recientes a nivel de laboratorio han demostrado que las respuestas algales a diferentes tóxicos son modificadas por la presencia de otra alga (17-19). En este estudio *Chaetoceros* en cultivo unialgal mostró mayor sensibilidad que *Nitzschia* a las concentraciones altas del metal, mientras que en el cultivo bialgal *Chaetoceros* mostró resistencia a esas concentraciones. Quizás las relaciones competitivas fueron alteradas en la presencia del metal.

De acuerdo a los resultados obtenidos el cobre no es tóxico para *Nitzschia*, de tal manera que en cultivo bialgal con *Chaetoceros*, la absorción del metal por parte de

Nitzschia podría haber reducido el metal disponible para cada célula de *Chaetoceros* y así ésta no se vio afectada por el metal.

Fedorov y Kustenko (46) estudiaron la competencia entre las diatomeas *Thalassiosira nitzschiioides* y *Skeletonema costatum* para la absorción de nitrógeno. Demostraron que ninguna de las dos algas puede llevar la ventaja una sobre la otra en cultivo mixto con la misma densidad celular inicial, dándose una inhibición recíproca que estuvo adscrita a la producción de metabolitos externos. Se ha reportado además, que las sustancias excretadas por una microalga podrían tener diferentes efectos sobre otra microalga, de acuerdo a la fase del crecimiento y subsecuente estado fisiológico algal (47).

Una capacidad superior para obtener y utilizar recursos (48) y la producción de exocrinas alelopáticas (49,50) pueden contribuir también al éxito competitivo de una microalga, afectando por lo tanto todo el ecosistema.

Puesto que el fitoplancton frecuentemente compite por recursos limitantes en la naturaleza, las pruebas que evalúan a los contaminantes en cultivos mixtos probablemente dan un indicio más ecológico de la sensibilidad algal que los que usan una sola alga (51).

El cobre y otros contaminantes podrían alterar las comunidades algales naturales al suprimir a las especies sensibles y permitir que las formas resistentes a contaminantes se hagan dominantes. En los ambientes eutróficos, las alteraciones de las comunidades algales podrían reducir además, la ya reducida diversidad de especies, agravando los problemas de floraciones algales y contribuyendo a la degradación general del ecosistema.

Las interacciones entre las especies algales en cultivo ocurren bajo la forma de competencia por nutrientes, tanto inorgánicos (52) como orgánicos (53), entre los que

se incluyen vitaminas, y bajo la forma de alelopatía (49,54). Además, tales interacciones están influenciadas por factores tales como intensidad de la luz, temperatura y tamaño de la población (54,55); por lo que no sólo el grado, sino también el resultado de la competencia depende de estos factores.

Los resultados obtenidos demuestran que concentraciones altas de cobre disminuyen la tasa de crecimiento de ambas diatomeas (*Chaetoceros* y *Nitzschia*). La diatomea pennada (*Nitzschia*) resultó menos afectada. Estas microalgas no fueron afectadas por las concentraciones bajas probablemente por mecanismos de exclusión o procesos internos de desintoxicación. Estos resultados indican además, que el efecto del cobre se ve afectado por su interacción con factores como salinidad y tipo de cultivo (unialgal o bialgal). Esto nos indica la importancia de tomar en cuenta esos factores, entre otros, cuando se evalúa la toxicidad de un contaminante.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los cultivos bialgales, bajo las concentraciones altas del metal la respuesta de una microalga puede modificarse por la presencia de la otra, dependiendo de las condiciones experimentales que se utilicen y posiblemente de la excreción de metabolitos.

Agradecimiento

Los autores agradecen el apoyo y asesoría brindados por la Gerencia de Ecología e Impacto Ambiental de INTEVEP, y en especial a Jorge Rodríguez Grau y Mercedes Esclapés. Agradecemos a Larry Brand del Rosenstiel School of Marine and Atmospheric Science de la Universidad de Miami por la asesoría prestada. De la misma manera agradecemos a Belkys Bracho y Alfonso del Villar por su asesoría en el análisis estadístico de los resultados. Esta investigación fue financiada parcialmente por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanis-

tico de la Universidad del Zulia (CONDES) a través del proyecto 1870-93.

Referencias Bibliográficas

1. MALLICK N., RAI L.C.: Response of *Anabaena doliolum* to bimetallic combinations of Cu, Ni, and Fe with special reference to sequential addition. *J Appl Phycol* 1:301-306, 1989.
2. MOREL F.M., HUDSON R.J., PRICE N.M.: Limitation of productivity by trace metals in the sea. *Limnol Oceanogr* 36(8):1742-1755, 1991.
3. WONG P.K., CHANG L.: Effects of copper, chromium and nickel on growth, photosynthesis and chlorophyll 'a' of *Chlorella pyrenoidosa* 251. *Environ Pollut* 72:127-139, 1991.
4. MILLINGTON L.A., GOULDING K.H., ADAMS N.: The influence of growth medium composition on the toxicity of chemicals to algae. *Water Res* 22(12):1593-1597, 1988.
5. STAUBER J.L., FLORENCE T.M.: Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. *Mar Biol* 94:511-519, 1987.
6. STEEMANN N., BRUUN L.: Effect of CuSO₄ on the photosynthetic rate of phytoplankton in four Danish lakes. *Oikos* 27:239-242, 1976.
7. McNIGHT D.M., MOREL F.M.: Release of weak and strong copper-complexing agents by algae. *Limnol Oceanogr* 24(5):823-837, 1979.
8. MANPING Z., BOSHU G., ZHENGBEN Z., LIANSHENG L.: Heavy metal complexation capacity of the South China sea water. *Chin J Oceanol Limnol* 8(2):158-166, 1990.
9. XUE H., SIGG L.: Binding of Cu(II) to algae in a metal buffer. *Water Res* 24(9):1129-1136, 1990.
10. VISVIKI I., RACHLIN J.W.: Ultrastructural changes in *Dunaliella minuta* following acute and chronic exposure to copper and

- cadmium. *Arch Environ Contam Toxicol* 23:420-425, 1992.
11. METAXAS A., LEWIS A.G.: Copper tolerance of *Skeletonema costatum* and *Nitzschia thermalis*. *Aquat Toxicol* 19:265-280, 1991.
 12. MANDELLI E.F.: The inhibitory effects of copper on marine phytoplankton. *Contr Mar Sci* 14:47-57, 1969.
 13. STEEMANN N., NIELSEN K.: Influence of deleterious concentrations of copper on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*. *Physiol Plant* 23:828-840, 1970.
 14. FISHER N.S., FROOD D.: Heavy metals and marine diatoms: Influence of dissolved organic compounds on toxicity and selection of metal tolerance among four species. *Mar Biol* 59:85-93, 1980.
 15. LUMSDEN B.R., FLORENCE T.M.: A new algal assay procedure for the determination of the toxicity of copper species in sea water. *Environ Technol Lett* 4:271-276, 1983.
 16. SWARTZMAN G., TAUB F.B., MEADOR J., HUANG C., KINDIG A.: Modeling the effect of algal biomass on multispecies aquatic microcosms response to copper toxicity. *Aquat Toxicol* 17:93-118, 1990.
 17. LI W.K.: A modified logistic growth equation: Effects of cadmium chloride on the diatom *Thalassiosira weissflogii* and the dinoflagellate *Amphidinium carteri* in unialgal and bialgal batch cultures. *Aquat Toxicol* 5:307-313, 1984.
 18. HARRAS M.C., KINDIG A.C., TAUB F.B.: Responses of blue-green and green algae to streptomycin in unialgal and paired culture. *Aquat Toxicol* 6:1-11, 1985.
 19. MAYASICH J.M., KARLANDER E.P., TERLIZI D.E.: Growth responses of *Nannochloris oculata* Droop and *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin to the herbicide atrazine as influenced by light intensity and temperature in unialgal and bialgal assemblage. *Aquat Toxicol* 10:187-197, 1987.
 20. DE NOYELLES F., KETTLE W.D., SINN D.E.: The responses of plankton communities in experimental ponds to atrazine, the most heavily used pesticide in the United States. *Ecology* 63:1285-1293, 1982.
 21. BRAND L.E., SUNDA W.G., GUILLARD R.R.L.: Reduction of marine phytoplankton reproduction rates by copper and cadmium. *J Exp Mar Biol Ecol* 96:225-250, 1986.
 22. BRAND L.E., GUILLARD R.R.L.: A method for the rapid and precise determination of acclimated phytoplankton reproduction rates. *J Plankton Res* 3(21):193-201, 1981.
 23. SCHOEN S.: Cell counting. In: *Experimental Phycology. A Laboratory Manual*. LOBBAN C.S., CHAPMAN D.J., KREMER B.P. (eds). Cambridge University Press, 1988, pp. 17-22.
 24. HELWIG J.T.: *Guía Introductoria al SAS*. SAS Institute Inc., 1981, p. 95.
 25. CASTRO C.: El Uso de las Transformaciones (Trabajo de Ascenso). pp. 118. La Universidad del Zulia, Maracaibo (Venezuela), 1984.
 26. FISHER N., JONES G., NELSON D.: Effects of copper and zinc on growth, morphology and metabolism of *Asterionella japonica* (Cleve). *J Exp Mar Biol Ecol* 51:37-56, 1981.
 27. GROSS R., PUGNO P., DUGGER W.: Observations on the mechanisms of copper damage in *Chlorella*. *Plant Physiol* 46:183-185, 1970.
 28. BENTLEY-MOWAT J.A., REID S.M.: Survival of marine phytoplankton in high concentrations of heavy metals, and uptake of copper. *J Exp Mar Biol Ecol* 26:249-264, 1977.
 29. FOSTER P.L.: Copper exclusion as a mechanism of heavy metal tolerance in a green algae. *Nature* 269(22):322-323, 1977.
 30. MOREL N.M., RUETER J.G., MOREL F.M.: Copper toxicity to *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *J Phycol* 14:43-48, 1978.

31. SUNDA W.G., GUILLARD R.R.L.: The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. **J Mar Res** 34:511-529, 1976.
32. ANDERSON D.M., MOREL F.M.: Copper sensitivity of *Gonyaulax tamarensis*. **Limnol Oceanogr** 23(2):283-295, 1978.
33. SUNDA W.G., FERGUSON R.L.: Sensitivity of natural bacterial communities to additions of copper and to cupric ion activity: A bioassay of copper complexation in sea water. In: **Trace Metal in Seawater**. WONG C.S., BOYLE E., BRULAND K.W., BURTON J.D., GOLDBERG E.D. (eds). Plenum Press, New York, NY, USA, 1983, pp. 871-891.
34. GAVIS J., GUILLARD R.R.L., WOODWARD B.L.: Cupric ion activity and the growth of phytoplankton clones isolated from different marine environments. **J of Mar Res** 39:315-333, 1981.
35. HUNTSMAN S. AND SUNDA W.: The role trace metals in regulating phytoplankton growth with emphasis on Fe, Mn and Cu. In: **The Physiological Ecology of Phytoplankton**. Studies in Biology, Vol. 7. MORRIS Y. (de). University of California Press, 1980, pp.285-327.
36. SPRAGUE J.B.: Factors that Modify Toxicity. In: **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications**. RAND G.M. AND PETROCELLI (eds). Hemisphere Publishing Corporation, Toronto, 1985, pp. 124-163.
37. JENSEN A., RYSTAD B.: Heavy metal tolerance of marine phytoplankton. II. Copper tolerance of three species in dialysis and batch cultures. **J Exp Mar Biol Ecol** 22(3):249-256, 1976.
38. HALL A., FIELDING A.H., BUTLER M.: Mechanisms of copper tolerance in the marine fouling alga *Ectocarpus siliculosus* - evidence for an exclusion mechanism. **Mar Biol** 54:195-199, 1979.
39. RAI L.C., GAUR J.P., KUMAR H.D.: Phycology and heavy metal pollution. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society** 56:99-151, 1981.
40. RACHLIN J.W., WARKENTINE B., JENSEN T.E.: The growth responses of *Chlorella saccharophila*, *Navicula incerta* and *Nitzschia closterium* to selected concentrations of cadmium. **Bull Torrey Bot Club** 109:129-135, 1982a.
41. SORENTINO C.: Copper resistance in *Hormidium fluitans* (Gay) Heering (Ulotrichaceae, Chlorophyceae). **Phycologia** 24(3):366-368, 1985.
42. SILVERBERG B.A., WONG P.T., CHAU Y.K.: Effect of tetramethyl lead on freshwater green algae. **Arch Environ Contam Toxicol** 5:305-313, 1977.
43. SICKO-GOAD L., STOERMER E.F.: A morphometric study of lead and copper effects on *Diatoma tenue* var. *elongatum* (Bacillariophyta). **J Phycol** 15:316-321, 1979.
44. STEEMANN E., NIELSEN L., ANDERSEN W.: The effect of deleterious concentrations of copper on the photosynthesis of *Chlorella pyrenoidosa*. **Physiol Plant** 22:121-133, 1969.
45. GOWRINATHAN K.P., RAO V.N.: Detoxification of copper by *Nitzschia obtusa* Wm.Sm., a pennate diatom. **Bull Environ Contam Toxicol** 45:609-612, 1990.
46. FEDOROV V.D., KUSTENKO N.G.: Competition between marine planktonic diatoms in monoculture and mixed culture. **Oceanology** 12:91-100, 1972.
47. BONIN D.J., MAESTRINI S.Y., LEFTLEY J.W.: Some processes and physical factors that affect the ability of individual species of algae to compete for nutrient partition. In: **Physiological Bases of Phytoplankton Ecology**, Can Bull Fish Aquat Sci 210. PLATT T. (ed). Department of Fisheries and Oceans, Ottawa, 1981, pp. 292-309.
48. D'ELIA C.F., GUILLARD R.R.L., NELSON D.M.: Growth and competition of the marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*. I. Nutrient effects. **Mar Biol** 50:305-312, 1979.

49. SHARP J., UNDERHILL P.A., HUGHES D.J.: Interaction (Allelopathy) between marine diatoms: *Thalassiosira pseudonana* and *Phaeodactylum tricornutum*. *J Phycol* 15:353-362, 1979.
50. PINTNER I.J., ALTMAYER V.L.: Vitamin B₁₂-binder and other algal inhibitors. *J Phycol* 15:391-398, 1979.
51. MOSSER J.L., FISHER N.S., WURSTER C.F.: Polychlorinated biphenyls and DDT alter species composition in mixed cultures of algae. *Science* 176:533-535, 1972.
52. MAESTRINI S.Y., BONIN D.J.: Allelopathic relationship between phytoplankton species. In: *Physiological Bases of Phytoplankton Ecology, Can Bull Fish Aquat Sci* 210. PLATT T.(ed). 1981, pp. 323-338.
53. BONIN D.J., MAESTRINI S.Y.: Some processes and physical factors that affect the ability of individual species of algae to compete for nutrient partitions. In: *Physiological Bases of Phytoplankton Ecology, Can Bull Fish Aquat Sci* 210. PLATT T. (ed). 1981, pp. 292-309.
54. ELBRACHTER M.: Population dynamic studies on phytoplankton cultures. *Mar Biol* 35:201-209, 1976.
55. KAYSER H.: Growth interactions between marine dinoflagellates in multispecies culture experiments. *Mar Biol* 52:357-369, 1979.